

**Zur Frage
der chemischen Spezifität
der antagonistischen Hemmung
der bakteriziden Wirkung
von Invertseifen**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel**

vorgelegt von

Theodor Binder

(staatenlos)



1949

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Herrn Prof. Dr. Rolf Meier.

Tag der Promotion : 13. Februar 1948.

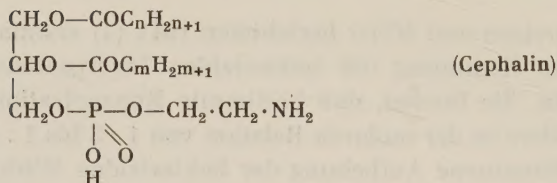
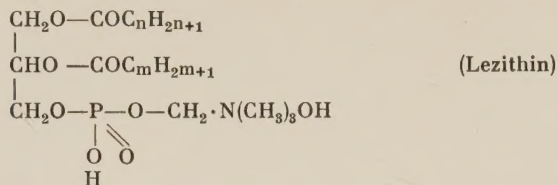


Sonderdruck aus „Schweiz. Zeitschrift für Pathologie und Bakteriologie“
Vol. XII, Fasc. 1 (1949)

Baker, Harrison und Miller berichteten 1941 (1) erstmalig über die spezifische Hemmung der bakteriziden Invertseifenwirkung durch Lezithin. Sie fanden, daß bestimmte Konzentrationen von Lezithin, die etwa in der molaren Relation von 1 : 3 bis 1 : 10 standen, eine vollkommene Aufhebung der bakteriziden Wirksamkeit verschiedener anionischer und kationischer Invertseifen bewirken. Weiterhin haben die gleichen Autoren die Hemmung der Invertseifenwirkung durch Gallensäuren beschrieben. Die antagonistische Wirkung von gallensauren Salzen gegenüber Invertseifen wurde später auch von *Westphal* und *Jerchel* bestätigt (2). Es ist nicht bekannt, ob der inhibitorische Mechanismus für beide Fälle derselbe ist. Diese Beobachtungen zeigten, daß außer dem Lezithin Stoffe durchaus differenter chemischer Struktur eine antagonistische Wirkung besitzen können. Es wurde des weiteren von *Grumbach* (3) gefunden, daß die Invertseifenwirkung durch Zusatz von gewöhnlicher Seife zum Nährboden beeinträchtigt wird. Nach den Untersuchungen von *Neufeld*, *Schiemann* und *Schütz* (4) verschlechtert bei der chirurgischen Händedesinfektion die primäre Seifenwaschung die Wirkung einer nachfolgenden Desinfektion mit Invertseife. In gleicher Richtung weisen die Empfehlungen der Chirurgen — so von *A. Christ* (5) —, daß bei der Händedesinfektion nach der üblichen gründlichen Reinigung mit heißem Wasser, Seife und Bürste alle Seifenspuren restlos weggespült sein müssen, damit die nachfolgende Desinfektion mit Invertseife wirksam sei. Ein Zusammenhang zwischen der Wirkung der verschiedenartigen Stoffe wurde bisher nicht näher in Betracht gezogen.

Es schien deshalb von Interesse, zur Aufklärung des Mechanismus den Versuch zu machen, eine Reihe einfacher Analogen der wirksamen Stoffe hinsichtlich ihrer antagonistischen Wirksamkeit zu prüfen. Hierfür wurden vor allem einfache Bruchstücke des Lezithins verwandt.

Die besonders antagonistisch wirksamen Monoaminophosphatide Lezithin und Cephalin



bestehen aus Fettsäuren, Glycerinphosphorsäureester und Cholin, bzw. Colamin. Es wurden somit diese Bruchstücke und analoge Verbindungen auf ihre antagonistische Wirkung geprüft

Methodisches Vorgehen.

Es wurde die antagonistische Wirksamkeit aller Stoffe so geprüft, daß gleiche Mengen der Antagonisten mit einer Konzentrationsreihe der Invertseife gemischt wurden, die Konzentrationen von der Schwellenkonzentration bis zum 300fachen derselben umfaßte. Die Wirkungsstärke der antagonistischen Wirkung ergibt sich aus der noch in ihrer bakteriziden Wirksamkeit vollständig gehemmten Wirkung der Invertseife. Als Desinfektionsmittel wurde eine neue Invertseife, die in den wissenschaftlichen Laboratorien der CIBA AG. von Dr. Bosshard hergestellt wurde, verwandt. Es handelt sich um Phenoxyaethyl-dimethyl-dodecyl-ammonium-bromid¹.

Versuchsordnung.

Je 2,5 ccm der wässrigen Invertseifenlösung wurden in fallenden Konzentrationen — beginnend mit 1000 mg^o/o — in Reagenzgläser gebracht. Dazu wurden je 2,5 ccm einer 100 mg^o/oigen Suspension, bzw. Emulsion der zu prüfenden Substanz, bzw. 2,5 ccm Aqua dest. (für den Wasserversuch) gegeben. Die Suspensionen, bzw. Emulsionen wurden ohne Zusatz eines Emulgators durch Schütteln mit der Schüttelmaschine hergestellt. Von C₁₀H₂₀O₂ (Caprinsäure) an mußten die gesättigten Fettsäuren außerdem erst im Wasserbad erhitzt werden, da ihre Schmelzpunkte über Zimmertemperatur lagen und sie in fester Form nicht emulgierbar waren. Dann wurden je 5 ccm einer mit Coli-

¹ Diese wurde in freundlicher Weise von der CIBA AG. zur Verfügung gestellt.

Oben ist die Invertseifenkonzentration angegeben. Die 1. Reihe bedeutet den Wasserverbrauch, die 2. den Leerversuch und die 3. den Bakterienversuch. Die Buchstaben bezeichnen das Resultat nach 24stündiger Bebrütung:

k = klar,

h. T. = homogene Trübung,

S = schlierenförmige Trübung durch Bakterienwachstum.

Die erhaltenen Hemmungswerte wurden tabellarisch zusammengefaßt. Die in den Tabellen der Arbeit angegebenen Werte beruhen auf mindestens drei gleichartigen Versuchen. Auf Grund der erhaltenen Werte wurden die molaren Konzentrationsverhältnisse des antagonistischen Effektes errechnet.

Versuchsergebnisse.

Die Untersuchung der Komponenten des Lezithinmoleküls ergab, daß eine wesentliche antagonistische Wirkung weder durch den Phosphorsäureester-Anteil noch die basischen Alkohole bewirkt wird, während die freien Fettsäuren, die im Lipoidmolekül vorkommen, eine ausgesprochen antagonistische Wirkung besitzen.

TABELLE I.

Antagonistische Wirkung der Lezithin- und Cephalinbausteine und daraus errechnete molare Konzentrationsverhältnisse der Antagonisten:

mg ⁰ / ₁₀ Konz. Inv. Seife	Molare Konzentr.-Verhältnisse der Antagonisten						
	1: 5	1: 290	1: 330	1: 800	1: 16	1: 48	1: 14
100							
30							
10	+				+		+
3	+				+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+
0,3	+	+	+	+	+	+	+
	Cephalin Lezithin „Kahlbaum“	Na glycerinphosph.	Cholin (Chlorhydr.)	Colamin	Palmitinsäure	Stearinsäure	Ölsäure
							H ₂ O

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Es scheint somit, daß von den im Lezithinmolekül vorliegenden Stoffen im wesentlichen der Fettsäurekomponente die antagonistische Wirkung zukommt. Es erhob sich damit die Frage, ob es sich hier um eine Wirkung der aliphatischen Säure überhaupt handelt oder ob deren antagonistischer Effekt nur von Säuren bestimmter chemischer Struktur gegeben wird. Es wurden aus diesem Grund Fettsäuren von verschiedener Kettenlänge und von verschiedenem Sättigungsgrad der aliphatischen Kette untersucht.

Die mit den gesättigten Fettsäuren erhaltenen Werte sind in Tabelle II zusammengestellt.

TABELLE II.

Antagonistische Wirkung der gesättigten Fettsäuren und daraus errechnete molare Konzentrationsverhältnisse der Antagonisten.

mg% Konz. Inv. Seife	Molare Konzentrationsverhältnisse der Antagonisten									
	1: 5	1: 400	1: 360	1: 320	1: 80	1: 73	1: 7	1: 6	1: 16	1: 48
100										
30							+	+		
10	+						+	+	+	
3	+				+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lezithin	Capronsäure	Oenanthsäure	Caprylsäure	Caprinsäure	Undecylsäure	Laurinsäure	Myristinsäure	Palmitinsäure	Stearinsäure

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Es ergibt sich auf Grund dieser Werte sehr eindeutig, daß die antagonistische Wirksamkeit der gesättigten aliphatischen Säuren von ihrer Kettenlänge abhängig ist. Mit zunehmender CH_2 -Zahl steigt die Wirksamkeit von der Capronsäure zur Laurinsäure an und fällt dann bei der Stearinsäure ab. Es scheint somit die antagonistische Wirkung am ausgesprochensten bei Säuren mit einer Kettenlänge zu sein, die derjenigen der in der Invertseife vorliegenden Fettsäure entspricht, bei der es sich um ein Laurinsäurederivat handelt.

Es soll damit nicht ohne weiteres behauptet werden, daß ihre Kettenlänge direkt der verantwortliche Faktor ist; es ist durchaus möglich, daß von der Struktur abhängige physikalisch-chemische Eigenschaften in Betracht kommen. Wie sich aus Tabelle I ergibt, besteht zwischen den ungesättigten und gesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge kein wesentlicher Unterschied der Wirksamkeit, so daß anscheinend der Sättigungsgrad selber kaum mit der antagonistischen Wirkung im Zusammenhang steht. Dafür sprechen auch die in der Tabelle III zusammengestellten Versuchsergebnisse mit drei ungesättigten Fettsäuren, von denen sich die Crotonsäure ($C_4H_6O_2$) als wirkungslos erwies, während die Ölsäure und Linolsäure (beide $C_{18}H_{34}O_2$) einen ausgesprochenen antagonistischen Effekt zeigten.

TABELLE III.

Antagonistische Wirkung dreier ungesättigter Fettsäuren und daraus errechnete molare Konzentrationsverhältnisse der Antagonisten.

mg% Konz. Inv. Seife	Molare Konz.-Verhältnisse der Antagonisten			
	1:400	1: 14	1: 14	
100				
30				
10		+	+	
3		+	+	
1	(+)	+	+	
0,3	+	+	+	+
	Crotonsäure	Ölsäure	Linolsäure	H ₂ O

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Trotzdem bei dem verwendeten pH des Mediums damit zu rechnen ist, daß ein Teil der Fettsäuren zum mindesten als Salz vorliegt, wurden die gleichen Versuche mit Zusatz von selbst hergestellten definierten Salzen (Seifen) der Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure durchgeführt. Wie Tabelle IV zeigt, war der antagonistische Effekt derselbe wie derjenige der zugrundeliegenden Fettsäure.

TABELLE IV.

Antagonistische Wirkung der Salze (Seifen) der Laurin-, Myristin- und Palmitinsäure.

mg% Konz. Inv. Seife	Hemmung der Bakteriostase			
100				
30	+	+		
10	+	+	+	
3	+	+	+	
1	+	+	+	
0,3	+	+	+	+
	Laurin-Na	Myristin-Na	Palmitin-Na	H ₂ O

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Es ist somit zu vermuten, daß der Effekt der Seife auch auf der Wirkung der in ihr vorhandenen Fettsäure bestimmter Kettenlänge beruht. Hierzu wäre noch zu beweisen, daß auch in Gegenwart relativ unwirksamer Fettsäuren die wirksame nicht in ihrem Effekt beeinträchtigt wird. Wie die folgende Tabelle zeigt, hatten Mischungen von Fettsäuren untereinander und mit Fettsäuren enthaltenden Substanzen, wie Talg und Olivenöl, den inhibierenden Effekt der wirksamsten in ihnen enthaltenen Fettsäure.

TABELLE V.

Antagonistische Wirkung einiger Fettsäurederivate und Netzmittel, und mit Talg und Olivenöl.

mg ^o /o Konz. Inv. Seife	Hemmung der Bakteriostase							
100								
30								
10				+	+	+	+	+
3		+		+	+	+	+	+
1		+	+	+	+	+	+	+
0,3		+	+	+	+	+	+	+
	Caprins. + Undecyls.	Crotons. + Caprons.	Stearins. + Ölsäure	Palmitins. + Stearin- säure + Talg	Ölsäure + Linolsäure + Olivenöl	Ölsäure + Linolsäure + Crotonsäure	Palmitins. + Capryls.	H ₂ O

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Die ausgesprochene Wirksamkeit der Fettsäuren ließ es angezeigt erscheinen, einige Derivate der Fettsäuren und besonders Fette und Öle auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen: Öle, auch Ester stark wirksamer ungesättigter Fettsäuren, zeigten sich wirkungslos. Talg zeigte eine geringe Wirkung, doch ist bei ihm wohl die Anwesenheit freier Fettsäuren nicht ganz ausgeschlossen. Daß die antagonistische Wirkung bestimmter Stoffe nicht auf einem einfachen physikalischen «Emulgiervorgang» beruht, konnte dadurch bewiesen werden, daß Paraffin selbst keinerlei antagonistische Wirksamkeit hat. Eine nicht ganz unbeträchtliche Wirkung zeigten Verbindungen vom Tweentypus (= Gemisch von Sordit, Polyoxyaethylenderivaten und Monopalminat bzw. Monooleat). Diese als Netzmittel verwandten Stoffe enthalten Fettsäuren in eigenartiger Bindung, in der offenbar ein Effekt, wie ihn die freie Fettsäure bewirkt, erhalten bleibt.

TABELLE VI.

Antagonistische Wirkung einiger Fettsäurederivate und Netzmittel.

mg% Konz. Inv. Seife	Hemmung der Bakteriostase						
100							
30							
10							
3			+		+	+	
1			+		+	+	
0,3	+	+	+	+	+	+	+
	Oliven-Öl	Arachis-Öl	Talg	Vaselin-Öl	Tween 40	Tween 80	Vaselin. alba H ₂ O

+ = Bakterienwachstum = Hemmung der Bakteriostase.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß der Antagonismus Fettsäure/Invertseife mindestens von der gleichen Intensität ist wie derjenige des Lezithins, daß weiterhin die Spezifität des Effektes an bekannte chemische Konstitutionen der Fettsäuren gebunden ist.

Für die Deutung des Lezithin-Invertseifen-Antagonismus wird besonders auf Grund der von E. Beck (7) im gleichen Institut vorgenommenen Versuche eine Reaktion des Lezithins mit der Invertseife angenommen; diese wurde auf Grund eines genau analysierten Reaktionsgleichgewichtes geschlossen. Es ist möglich, daß im Falle des Antagonismus Fettsäure/Invertseife ähnliche Verhältnisse

vorliegen. Es spricht hierfür die Tatsache, daß die Oberflächenspannungskurven einer Mischung von Invertseife + wirksamer Fettsäure einen ähnlichen Verlauf zeigen wie die von Beck für die Mischung Invertseife + Lezithin ermittelte Kurve. Die Oberflächenspannung wurde wie folgt bestimmt:

Methode: Zu je 5 ccm einer Konzentrationsreihe der Invertseife werden 5 ccm einer 100 mg⁰/oigen Emulsion der Fettsäure gegeben und die Oberflächenspannung dieser Gemische gemessen. Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurde die Torsionswaage benutzt (Abreißmethode).

Kurze Beschreibung der Abreißmethode: Die Kraft — gemessen an der Torsionswaage —, die nötig ist, um ein Platinplättchen von der zu untersuchenden Flüssigkeitsoberfläche abzureißen, erlaubt es, die Oberflächenspannung in dyn nach einer Formel von Tominaga (8) auszurechnen:

$$\text{Oberflächenspannung} = 1,18 \cdot \frac{W_x}{W} - 0,18 \cdot 73 \text{ dyn.}$$

$W_x = K_x - G_x$ = Differenz des Abreißwertes der zu untersuchenden Flüssigkeitsoberfläche (K_x) und des Gewichtes des Platinplättchens mit dem daranhängenden Flüssigkeitstropfen (G_x).

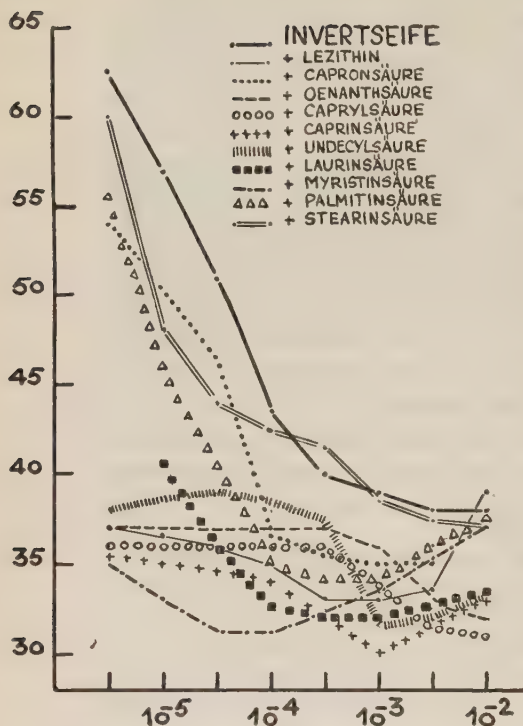
$W = K - G$ = Differenz des Abreißwertes von reinem Wasser (K) und des Gewichtes des Platinplättchens mit dem daranhängenden Wassertropfen (G).

73 dyn = Oberflächenspannung des reinen Wassers.

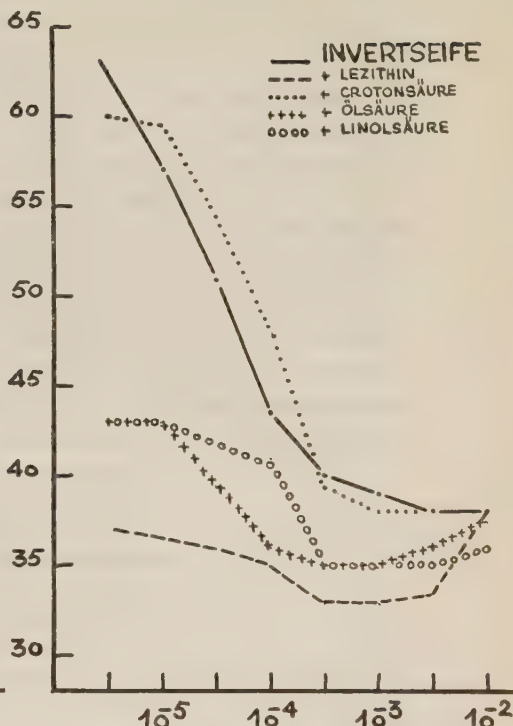
Das Plättchen wird nicht genau senkrecht von der Flüssigkeitsoberfläche abgerissen, weshalb in der Formel noch eine empirisch gefundene Korrektur angebracht ist.

Die Ergebnisse sind in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt (S. 94). Die Oberflächenspannungskurve der Invertseife allein sowie diejenige des Lezithins sind ebenfalls eingezeichnet. Aus dem Vergleich der beiden Abbildungen geht hervor, daß sich wirksame gesättigte und ungesättigte Fettsäuren analog verhalten.

Zur weiteren Abklärung des physiko-chemischen Mechanismus der antagonistischen Wirkung der Fettsäuren gegenüber Invertseife wurde untersucht, ob sich eine der Invertseife-Lezithin-*in vitro*-Reaktion, wie sie von Beck beschrieben wurde, ähnliche Reaktion zwischen Invertseife und Fettsäuren feststellen läßt. Es erhebt sich hier eine Schwierigkeit darin, daß die Fettsäuren bereits in der wässrigen Phase zum Teil lösen, zum Teil nur emulgieren. Man kann aus dem Verhalten der Mischung aber gewisse Schlußfolgerungen ziehen. Die wirksamsten Fettsäuren bilden eine wässrige Emulsion. Bis zur Wirksamkeitsgrenze tritt meist eine verstärkte Trübung der Emulsion auf, während bei Überschreiten dieser Grenze Klärung erfolgt. Dieses Verhalten gilt auch im Prinzip für diejenigen wirksamen Fettsäuren, die in Wasser praktisch löslich sind. Trotzdem stimmen die antagonistischen



Ordinate: Oberflächenspannung in dyn
Abszisse: Log. Konzentration der Invert-seife



Ordinate: Oberflächenspannung in dyn
Abszisse: Log. Konzentration der Invert-seife

Wirksamkeitsgrenzen nicht mit diesen Fällungszonen direkt überein. Dies zeigt offenbar an, daß, obschon eine prinzipiell ähnliche Reaktion vorhanden ist, das Reaktionsgleichgewicht so verschieden ist, daß in gewissen Fällen eine so hohe Konzentration des Desinfektionsmittels in Lösung bleibt, daß der Verlauf der Reaktion mit Hilfe des bakteriziden Schwellenwertes nicht mehr erkannt werden kann. Immerhin darf wohl auf Grund dieser Befunde angenommen werden, daß im Prinzip eine Reaktion der Invertseife mit der Fettsäure die Ursache des Inhibitionsvorganges ist.

Methode: Zu je 5 ccm einer Konzentrationsreihe der Invertseife wurden 5 ccm einer 100 mg^o/oigen Fettsäuren-Emulsion zugegeben und die dabei entstehende, bzw. nicht entstehende Fällung oder Trübung registriert.

Der gleiche Versuch wurde auch mit Talg, Olivenöl und Netzmitteln durchgeführt.

Um die Entscheidung: Trübung durch die Emulsion oder reaktive Trübung (= Fällung) sicher zu ermöglichen, wurde jeweils ein Leerversuch mit Aqua dest. (ohne Invertseifenzusatz) ausgeführt.

mg ^o /o Konz. Inv. Seife	1000	300	100	30	10	3	1	H ₂ O
Caprons.	k	k	k	k	k	k	k	k
Oenanth.	k	k	k	k	k	k	k	k
Capryls.	k	F	F	etw. F	Spur F	k	k	k
Caprins.	k	F	F	etw. F	E-T	E-T	E-T	E-T
Undecyls.	k	F	F	Spur F	Spur F	k	k	Spur E-T
Laurins.	k	leichte homog. T	F	—	—	feinflockige Trübung (E-T)	—	—
Myristins.	k	feinst- flock. T	dichte feinfl. T	—	—	homogene Trübung (E-T)	—	—
Palmitins.	k	Übergang	—	—	—	homogene Trübung (E-T)	—	—
Stearins.	k	Übergang	—	—	—	homogene Trübung (E-T)	—	—
Crotons.	k	k	k	k	k	k	k	k
Linols.	Spur T	Spur F	—	—	—	feine leichte Trübung (E-T)	—	—
Ölsäure	Spur F	leichte F	—	—	—	feinste leichte Trübung (E-T)	—	—
Olivensöl	—	—	—	—	—	durchgängig leichte Trübung (E-T)	—	—
Vasel. alba	k	k	k	k	k	k	k	k
Tween 40	k	k	k	k	k	k	k	k
Tween 80	k	k	k	k	k	k	k	k
Talg	—	—	—	—	—	durchgängig homogene Trübung (Talg E-T)	—	—

Legende: k = klar
F = Fällung
T = Trübung
E—T = Emulsionstrübung

Zusammenfassung.

Lezithin- und Cephalinbausteine wurden auf ihren antagonistischen Effekt gegenüber der bakteriziden Invertseifenwirkung an Colibazillen untersucht. Glycerinphosphorsäure und basische Alkohole erweisen sich als praktisch unwirksam; Fettsäuren — gesättigte und ungesättigte — zeigen zunehmend mit steigender CH₂-Zahl, mit einem Optimum bei C₁₂—C₁₄, eine antagonistische Wirkung von gleicher Stärke wie Lezithin. Physikalisch-chemische Untersuchung der Reaktion Invertseife/Fettsäure läßt besonders auf Grund der Analogie zur Invertseife/Lezithin-Reaktion (E. Beck u. R. Meier) eine in-vitro-Reaktion der beiden Komponenten als Ursache des Antagonismus annehmen.

Résumé.

L'auteur étudie sur le colibacille l'action antagoniste des composants de la lécithine et de la céphaline sur l'effet bactéricide des savons invertis. L'acide glycéro-phosphorique et les alcools basiques se sont avérés pratiquement inactifs; les acides gras (saturés et

non saturés) développent une action antagoniste augmentant en fonction du nombre des groupes CH_2 ; l'optimum, atteint vers C_{12} à C_{14} , est équivalent à l'action antagoniste de la lécithine. L'étude physico-chimique de la réaction savons invertis/acides gras permet, étant donné l'analogie avec la réaction savons invertis/lécithine (*E. Beck* et *R. Meier*), de conclure que l'action antagoniste résulte d'une réaction in vitro des corps en présence.

Riassunto.

Componenti di Lecitina e Cefalina furono esaminati dal punto di vista del loro effetto antagonistico verso saponi invertiti per azione battericida, in colibacilli. Acidi glicero-fosforici e alcoli basici si mostrano praticamente inattivi: acidi grassi, saturi e non saturi, mostrano una azione antagonista, che aumenta proporzionalmente al numero dei gruppi CH_2 con un ottimo a C_{12} — C_{14} , di forza uguale a quella della Lecitina. Indagini fisico-chimiche della reazione saponi invertiti/acidi grassi fanno ammettere, specialmente in rapporto all'analogia della reazione saponi invertiti/Lecitina (*E. Beck* e *R. Meier*), come origine dell'antagonismo una reazione in vitro di entrambi i componenti.

Summary.

The influence of lecithin and cephalin split products on the bactericidal effect of a detergent against *E. coli* was investigated. Glycero-phosphoric acid and basic alcohols showed practically no effect. Saturated and non-saturated fatty acids showed increasing antagonistic activity with increasing numbers of CH_2 groups. The optimum was reached in acids with C_{12} to C_{14} attaining the antagonistic strength of lecithin. The analogous physico-chemical reactivity between the detergent and fatty acids and between the detergent and lecithin (*E. Beck* and *R. Meier*) indicates that an in-vitro interaction between the two components is the cause of the antagonistic effect.

Literatur.

1. Z. Baker, R. W. Harrison, B. Miller: J. exp. Med. 74, 1941, 621. —
2. O. Westphal, D. Jerchel: Koll. Zs. 100/101, 1942, 213. — 3. A. Grumbach: Schw. med. Wschr. 71, 1520, 1941. — 4. Neufeld, Schieman, Schütz: Z. Hyg. 123, 1940, 147 (zit. nach Grumbach). — 5. A. Christ: Schw. med. Wschr. 72, 1942, 441. — 6. M. Allgöwer: Helv. Physiol. Acta 2, 569, 1944. — 7. G. E. Beck: Schw. Z. Path. u. Bakt. 11, 1948, 66; G. E. Beck u. R. Meier: Experientia 3, 1947, Nr. 9. — 8. T. Tominaga: Biochem. Z. 140, 1923, 230. — 9. W. Wilbrandt: Pflüg. Arch. 245, 1941, 22.

